Obtención de suspensiones celulares y embriones somáticos de cafeto (*Coffea canephora* P.) con el empleo de metabolitos bacterianos

Obtaining of cell suspensions and somatic embryos of coffee (*Coffea canephora* P.) using of bacterial metabolites

María Esther González Vega, Yanelis Castilla Valdés*, Annia Hernández Rodríguez****

Resumen

La embriogénesis somática es importante como sistema modelo para estudiar el desarrollo de eventos fisiológicos, citológicos y moleculares que sustentan la embriogénesis en plantas, por ser un sistema adecuado para la propagación masiva de especies vegetales y servir de herramienta para el mejoramiento genético, la conservación de germoplasma y la validación de nuevos productos biológicos, y facilitar la producción a gran escala a través del cultivo en medio líquido y su aplicación en biorreactores, proporcionando alta frecuencia de multiplicación, rápido crecimiento del embrión, facilidad de absorción de nutrientes y reducción de la labor de subcultivo. En este trabajo se empleó la embriogénesis somática como vía de multiplicación para evaluar el efecto de metabolitos bacterianos en la inducción de suspensiones celulares y embriones somáticos en tres genotipos de cafeto pertenecientes a *Coffea canephora* P. variedad Robusta. Para ello se estudiaron densidades de inóculo entre 0,2, 0,5, 1,0 y 3,0 gMF/L^{-1}, y se evaluó el efecto de diferentes medios de cultivo en el desarrollo del proceso. Los resultados mostraron un comportamiento diferenciado en el genotipo M-28, en medios de cultivo suplementados con reguladores de crecimiento convencionales y en los alternativos. Se evidenció una fuerte relación entre la viabilidad celular y el número de células, ante las diferentes condiciones de cultivo y según la densidad de inóculo, se observó un amplio rango de tamaño y forma en las poblaciones de embriones somáticos. Los porcentajes de conversión de ES con el medio MDE-2 evidenciaron mejoras de este indicador para el cultivo del cafeto.

Palabras clave: *Coffea canephora*, Robusta, densidad de inóculo, germinación, conversión.

Abstract

The somatic embryogenesis is important as model system to study the development of physiologic and molecular events that sustain the embryogenesis in plants, is an appropriate system for the massive propagation of vegetable species and as tool for the genetic improvement, the germplasm conservation and the validation of new biological products and to facilitate the multiplication to great scale through the culture in liquid medium, as well as application in bioreactores, providing high multiplication frequency, quick growth of the embryo, easiness of absorption of nutritious and reduction of the subculturing. In this paper the somatic embryogenesis was used to evaluate the effect of bacterial compounds in the induction of cellular suspensions and somatic embryos in three coffee genotypes of *Coffea canephora* P. var. Robusta. Were studied inoculo densities among 0.2, 0.5, 1.0 and 3.0 gMF/L-1 and the effect of different culture medium in the development of the process. The results showed a behavior differed in the genotype M-28, in medium culture with conventional regulators of growth and the alternatives. Strong relationship was evidenced between the cellular viability and the number of cells, in the different cultivation conditions and according to the inoculo density, a wide range of size and forms as observed in the

* Investigadoras, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), La Habana, Cuba. Esther@inca.edu.co Marylago00@yahoo.com

** Investigadora, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

populations of somatic embryos. The conversion percentages with the medium MDE-2, evidenced improvements of this indicator for the coffee.

Key words: *Coffea canephora*, Robusta, density, germination, conversion.

Recibido: septiembre 26 de 2008 **Aprobado**: mayo 5 de 2011

Introducción

Aunque la embriogénesis somática se informó por vez primera hace aproximadamente 50 años atrás, continúa siendo objeto de numerosos estudios por su importancia (von Arnold *et al*., 2002). Su connotación se debe a sus usos como sistema modelo para estudiar el desarrollo de los eventos fisiológicos, citológicos y moleculares que sustentan la embriogénesis en plantas (von Aderkas *et al*., 2001, 2002), por ser un sistema adecuado para la propagación masiva de algunas especies de plantas (Etienne *et al*., 2002), servir de herramienta para asistir el mejoramiento genético (Cerda *et al*., 2002) y a la conservación de germoplasma (Barrueto *et al*., 2004), así como a la validación de productos biológicos de nueva formulación (Cevallos, 2000; Wang y Zhong, 2002).

Además, facilita la producción a gran escala a través del cultivo en medio líquido (van Boxtel y Berthouly, 1996) y su aplicación en biorreactores (Barry *et al*., 2002), resultando muy importantes las condiciones del medio de cultivo, que deben ser ensayadas para cada caso en particular y modificadas durante el desarrollo del proceso embriogénico. El uso del medio líquido para desarrollar las etapas de proliferación del tejido embriogénico y de diferenciación de los embriones somáticos es, en la actualidad, bien conocido (Palada, 2002).

Las ventajas que este tipo de medio proporciona son numerosas, cabe destacar la alta frecuencia de multiplicación, un rápido crecimiento del embrión somático, facilidad de absorción de nutrientes, reducción de la labor de subcultivo y facilidad de automatización en biorreactores (Mauri y Manzanera, 2003).

Además, en la actualidad existen biopreparados bacterianos a base de metabolitos activos, con efectos favorables en la multiplicación por técnicas de cultivo *in vitro* de materiales seleccionados, dado que existe un elevado número de microorganismos que poseen la capacidad de producir sustancias promotoras del crecimiento vegetal, dentro de ellas las bacterias (Dibut *et al*., 2010), siendo el ácido 3-indolacético (AIA) una de las principales auxinas producidas por rizobacteias pertenecientes a las especies *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia*. En este sentido, también se ha comprobado que bacterias de la especie *Methylovorus mays* ejercen efectos benéficos en la morfogénesis y el crecimiento de vitroplantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), papa (*Solanum tuberosum*) y flax (*Linum usitatissimun*) (Kalyaeva, 2001), logrando en las vitroplantas colonizadas y cultivadas en un medio de regeneración, libre de vitaminas, incremento significativo del número de brotes y rápido desarrollo del sistema radical, efectos que se atribuyen a la producción de fitohormonas (citoquininas) y vitaminas.

En el presente estudio se empleó la embriogénesis somática como vía de multiplicación para evaluar el efecto de metabolitos activos procedentes de una cepa de *Burkholderia cepacia* caracterizada por estimular el crecimiento vegetal en la inducción de suspensiones celulares y embriones somáticos en tres genotipos de cafeto pertenecientes a *Coffea canephora* P. variedad Robusta, caracterizados por su autoincompatibilidad y resistencia o tolerancia a estrés abiótico.

Materiales y métodos

Material vegetal. La especie estudiada fue *Coffea canephora* Pierre ex Froehner variedad Robusta. Como material de partida se utilizaron callos obtenidos a partir de explantes foliares de los genotipos promisorios: M-229, K-234 y M-28, establecidos en condiciones de campo y procedentes del Banco de Germoplasma de la Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao (ECICC).

Condiciones experimentales generales. En los bioensayos se utilizaron como medio basal las sales minerales del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962), suplementado con inositol (100 mg/L^{-1}), vitaminas de Morell (4 mg/L^{-1}), cisteína-HCl (25 mg/L^{-1}) y sacarosa (30 g/L^{-1}). Los reguladores del crecimiento convencionales o sustitutos de estos fueron adicionados según se describe en cada bioensayo. El pH fue ajustado a 5,7 y la esterilización se realizó en autoclave a 121 °C, durante 15 min y 1,2 kg/cm^{-2}.

Los cultivos en medio líquido, para los diferentes ensayos, fueron establecidos bajo las siguientes condicio-

nes: agitación en zaranda orbital a 110 rpm, 27 ± 1 °C y fotoperiodo de 16 h luz / 8 oscuridad. Los subcultivos se realizaron cada 21 días, tomando como referencia los resultados obtenidos al evaluar las curvas de crecimiento celular para cada genotipo.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado describiéndose el número de tratamientos y de repeticiones según cada bioensayo.

Características y modo de empleo de los metabolitos bacterianos. Los metabolitos activos se obtuvieron a partir de una cepa nativa de la especie *Burkholderia cepacia*, aislada de la rizosfera del cultivo del maíz. La efectividad de los mismos se evaluó a través del empleo de un extracto auxínico obtenido según la metodología descrita por Tien *et al*. (1979).

Determinación de la densidad óptima de inóculo inicial. Para el establecimiento de la suspensión celular se utilizaron callos con estructuras embriogénicas de 28 y 35 días de cultivo de los 3 genotipos evaluados, caracterizados por una coloración blanco-cremosa y consistencia friable. Los mismos fueron previamente cultivados en el medio de formación de callos MFA-3, contentivo de 2,0 mg/L^{-1} de Kinetina y 0,7 mg/L^{-1} del extracto auxínico (González *et al.*, 2007), en condiciones de oscuridad. Las densidades de inóculo (DI) estudiadas fueron: 0,2, 0,5, 1,0 y 3,0 gMF/L^{-1}. Se emplearon erlenmeyers de 250 mL de capacidad, conteniendo 70 mL de medio de cultivo MMC-2 (tabla 1). Recipientes de cultivo con dichas características fueron utilizados en la producción de embriones somáticos.

A los 60 días de cultivo se evaluaron, en 10 muestras por tratamiento, las variables: coloración, concentración de células (número de cél/mL^{-1}), a través del conteo celular en cámara de Fuch Rosentals (García *et al.*, 1996) y viabilidad celular; para este último indicador se utilizó el método del colorante Azul de Evans (Pérez, 1998), creándose una escala cualitativa de 3 grados según la coloración de la suspensión:

Escala 1: viabilidad celular.

1-Sin color: viabilidad celular alta.

2-Azul claro: viabilidad celular moderada.

3-Azul intenso: viabilidad celular baja.

Obtención de embriones somáticos. Se emplearon suspensiones celulares embriogénicas de 2 meses de establecidas en el medio de cultivo MMC-2 y con una DI de 1 gMF/L^{-1} procedentes de los 3 genotipos evaluados. Se caracterizaron por una coloración blanco-cremosa y apariencia granulosa.

Para evaluar el efecto de dos medios de cultivo en la formación de embriones somáticos se utilizaron 70 mL de los medios de inducción de embriones MIE-1 (control) y MIE-2, donde la auxina ácido naftalenacético (ANA) fue sustituida por el extracto auxínico bacteriano (tabla 1). Se procedió a la inoculación de 5 erlenmeyers por tratamiento (medio de cultivo x genotipo) con 1 gMF/L^{-1} de las suspensiones celulares establecidas en el medio MMC-2.

A las 14 semanas de cultivo se procedió a la inoculación de 10 mL del cultivo en placas de Petri (5 placas por tratamiento) contentivas del medio para desarrollo de embriones MDE-1 (tabla 1). El medio se utilizó en estado semisólido, empleando 1 g/L^{-1} de agente gelificante gelrite para facilitar el conteo de los embriones. A los 30 días, y con ayuda de un microscopio estereoscópico marca Leica, se evaluó el número total de embriones somáticos (ES) y a partir de 100 ES se evaluó el número de estos por fase de desarrollo para cada genotipo.

Germinación y conversión de embriones somáticos. Se aislaron embriones somáticos en fase cotiledonar de aproximadamente 5,0-5,5 mm pertenecientes a los genotipos M-229, K-234 y M-28, obtenidos en medio líquido MIE-2 y se inocularon en el medio para desarrollo de embriones MDE-2 (tabla 1) con 0,5 mg/L^{-1} del extracto auxínico como sustituto del ANA. Como con-

Tabla 1. Reguladores del crecimiento (mg/L^{-1}) empleados para la producción de ES de *C. canephora* var. Robusta

Composición	U/M	MMC-2	MIE -1	MIE -2	MDE-1	MDE-2
Kinetina	mg/L^{-1}	0,2	0,5	0,5	2,0	2,0
ANA	mg/L^{-1}	-	0,1	-	0,1	-
Ext. Auxínico	mg/L^{-1}	0,7	-	0,7	-	0,5

MMC-2: medio de multiplicación celular-2; MIE-1: medio de inducción de embriones-1; MIE-2: medio de inducción de embriones-2; MDE-1: medio de desarrollo de embriones-1; MDE-2: medio de desarrollo de embriones-2.

trol se empleó el medio MDE-1 (tabla 1). Se utilizaron 30 tubos de ensayo de 15 cm de largo por 2,5 cm de ancho, con tapones de goma y contentivos de 15 mL del medio de cultivo, con 4 embriones cada uno para los tratamientos evaluados, y se sometieron a un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad y temperatura de 27±1 ^{0}C. Pasados 30 días, los embriones germinados se transfirieron a frascos de cultivo bajo condiciones de iluminación.

A los 20 días de cultivo se evaluó, en 50 muestras por tratamiento, el porcentaje de germinación, a los 60 días el porcentaje de emisión de hojas verdaderas y de formación de raíces secundarias, mientras que la conversión a plántulas fue evaluada a los 65 días de cultivo. Se realizaron 5 repeticiones por cada tratamiento y el experimento fue replicado 3 veces en el tiempo.

Análisis estadísticos. La normalidad de las variables evaluadas se comprobó por el método de Shapiro y Francia (1972). Los datos originales de las variables expresadas en porcentaje se transformaron mediante la fórmula $arcsen\sqrt{\%}$, y los datos de conteos celulares a través de la fórmula Log x para su análisis estadístico. A los valores de las diferentes variables se les realizó un análisis de varianza bifactorial utilizando el procesador estadístico Start (vesión 4.10, 1998) (Inca. Start, 1998). En los casos en que se observaron diferencias significativas se aplicó la prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5% para la comparación de las medias utilizando el programa Statgraphics (1999).

Resultados y discusión

Determinación de la densidad óptima del inóculo inicial. Se detectó interacción entre los factores, con diferencias significativas entre los tratamientos, los resultados se muestran en la tabla 2. El mayor valor de número de células se obtuvo para el genotipo M-229 y la densidad de inóculo de 1,0 gMF/L^{-1} con 45,88 x 10^{4} cél/mL^{-1}, valor que difirió de lo obtenido en el resto de las combinaciones para el genotipo mencionado. Sin embargo, el genotipo K-234 redujo el número de células al variar la DI de 0,5 a 1,0 g/MFL^{-1}, mientras que en el genotipo M-28 esta última DI permitió alcanzar los mayores valores de células.

Es de destacar que con la densidad de inóculo de 3 gMF/L^{-1} se obtuvieron los más bajos valores de concentración celular para los 3 genotipos evaluados en el presente estudio, al compararse los resultados con los obtenidos para las DI de 0,5 y 1,0 gMF/L^{-1}, comportamiento que pudiera ser explicado por la presencia de un autoantagonismo ligado a la DI, que al ser comparada con el comportamiento mostrado por los demás tratamientos resultó ser elevada, efecto que pudiera deberse a la acumulación de sustancias inhibidoras excretadas por las células de los callos, que conducen a la limitación del cultivo, ya que concentraciones desfavorables de sustancias inhibidoras pueden alcanzarse de forma rápida, con DI consideradas como elevadas.

Por su parte, Van Boxtel y Berthouly (1996), al evaluar el efecto de la DI en genotipos de *C. canephora* var. Robusta, diferentes a los evaluados en el presente trabajo, encontraron que DI superiores a 5,0 gMF/L^{-1} inhibieron el desarrollo de la embriogénesis somática. Efectos similares han sido informados para el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) (Ozawa y Komamine, 1999).

Los resultados citados demuestran la influencia de la variable en el proceso estudiado para el cultivo del cafeto, lo que pudiera contribuir a explicar el resultado obtenido con la DI de 3,0 gMF/L^{-1} en este estudio, y hace inferir que las DI de 0,5 y 1,0 gMF/L^{-1} empleadas favorecieron la multiplicación celular de los 3 genoti-

Tabla 2. Efecto de la DI en el número de células por mL (x10^4) en suspensiones de *C. canephora* var. Robusta

Genotipo	Densidad de inóculo (gMF/L^{-1})			
	3,0	1,0	0,5	0,2
M-229	29,26 f	45,88 a	42,80 bc	11,88 h
K-234	29,01 f	41,10 c	43,15 b	11,36 h
M-28	22,12 g	35,52 d	31,14 e	7,61 i
ES $\bar{x}$ (±)	0,058**			

Medias con letras comunes no difieren estadísticamente, según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan para p<0,05. ** significativo para p<0,01.

pos evaluados, corroborado por los niveles de concentración celular alcanzados.

Por otro lado, se observó que la DI de 0,2 gMF/L^{-1} condujo a una limitación del cultivo para los 3 genotipos; al parecer, el crecimiento no se inició hasta una determinada concentración, considerada como crítica, la limitación a su vez pudo ser acentuada por los subcultivos e influenciada por el genotipo. Un comportamiento similar con relación a la DI y la limitación del cultivo fueron señalados en otras plantas de cafeto por Montes *et al*. (1995), al estudiar el proceso de formación de embriones somáticos en medio líquido. Se ha informado que la inducción a la embriogénesis en el cafeto pudiera estar regulada por la presencia en el medio de cultivo de moléculas inductoras, como las glicoproteínas, similar a lo señalado para el cultivo de la zanahoria por De Vries (1988); dependiendo la respuesta, además, de las características de cada material, lo que coincide con resultados obtenidos en estudios precedentes en cafeto (Santana *et al*., 2004; Gatica *et al*., 2007).

El color de la suspensión fue otro indicador que varió según el genotipo y la DI, exceptuando a K-234 donde se mantuvo el color cremoso, con las diferentes DI estudiadas (tabla 3). Los resultados mostraron que la coloración blanco-crema fue buen indicador, al utilizar DI igual a 1 gMF/L^{-1} en el trabajo con las suspensiones, dada la correspondencia entre esta variable y el comportamiento logrado en los demás indicadores evaluados. En este caso la respuesta diferenciada de los genotipos pudiera atribuirse a la existencia de una gran variabilidad de compuestos fenólicos en *C. canephora* var. Robusta, característica que influye negativamente en el establecimiento de los cultivos debido a los daños celulares que ocasiona. Al respecto se señala que los compuestos fenólicos se enlazan a las proteínas, las inactivan e inhiben el crecimiento de los tejidos del explante (Vaugh, 1984).

Tabla 3. Coloración de la suspensión celular según la DI en *C. canephora* var. Robusta

Genotipo	Densidad de inóculo (gMF/L^{-1})			
	3,0	1,0	0,5	0,2
M-229	BC	BC	BC	CC
K-234	Cr	Cr	Cr	Cr
M-28	Cr	Cr	Cr	CO

BC-Blanco crema, Cr-Crema,
CC-Carmelita claro, CO: Carmelita oscuro

Al analizar el comportamiento de la viabilidad celular de las suspensiones se pudo observar que el mejor resultado se obtuvo con las DI de 0,5 y 1,0 gMF/L^{-1}, y el genotipo M-229, comportamiento similar al obtenido con 0,5 gMF/L^{-1} y el genotipo K-234 (tabla 4). El resto de las combinaciones presentó coloración azul claro o intenso, indicativo de una viabilidad celular media o baja. Se demostró que 3,0 gMF/L^{-1} resultó ser la densidad de inóculo menos favorable, ya que la viabilidad de las células en las suspensiones de los 3 genotipos fue baja. De forma general, la viabilidad celular en las suspensiones del genotipo M-28 fue inferior con relación a M-229 y K-234, y las variantes de densidad de inóculo evaluadas, corroborándose la menor capacidad de respuesta de este genotipo.

Tabla 4. Viabilidad celular en las suspensiones de *C. canephora* var. Robusta

Genotipo	Densidad de inóculo (gMF/L^{-1})			
	3,0	1,0	0,5	0,2
M-229	3	1	1	2
K-234	2	2	1	2
M-28	3	2	2	2

1-Sin color, 2-Azul claro, 3-Azul intenso

Este resultado contribuye a explicar el comportamiento del genotipo M-28 durante las fases de cultivo *in vitro* precedentes, ya que el grado de viabilidad determina el comportamiento ante las diferentes condiciones de cultivo. Así, los resultados obtenidos en el análisis de la viabilidad de las células se correspondieron con los valores del número de células, según la densidad de inóculo utilizada, lo que evidenció una fuerte relación entre dichas variables, aspecto de significativa importancia por su posible aplicación práctica.

Al discutir los resultados se observó la semejanza del proceso inducido al emplear diferentes DI con el descrito por algunos autores, que han destacado la importancia de utilizar densidades de inoculación que no conduzcan a una limitación de la producción y desarrollo de las estructuras embriogénicas, a fin de lograr mayores índices de multiplicación, aspecto que está estrechamente relacionado con el genotipo (Zamarripa *et al*., 1991; van Boxtel y Berthouly, 1996).

Formación de embriones somáticos. Los resultados de las evaluaciones realizadas con relación a la formación de embriones somáticos posterior a las 14 semanas de cultivo se muestran en la tabla 5. Se detectó interac-

ción significativa para los factores analizados, observándose una fuerte influencia del genotipo y el medio de cultivo utilizado. El mayor número de embriones somáticos, 30,9 x 10^3 ES/L^{-1}, se obtuvo en el genotipo M-229 con el medio MIE-2, que contenía 0,5 mg/L^{-1} de kinetina y 0,7 mg/L^{-1} del extracto auxínico.

Tabla 5. Formación de embriones somáticos en genotipos de *C. canephora* var. Robusta

Genotipo	Embriones totales (x 10^3 ES.L^{-1})	
	MIE-1	MIE-2
M-229	26,4 c	30,9 a
K-234	22,5 e	28,1 b
M-28	26,3 c	25,1 d
ES $\bar{x}$ (±)	0.17**	

Medias con letras comunes no difieren estadísticamente, según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan para $p < 0.05$. ** significativo para $p<0.01$

A este tratamiento le siguió el genotipo K-234 y la misma variante de medio de cultivo, que aunque difirió de los resultados anteriores, logró superar al resto de los tratamientos con 28,1 x 10^3 ES/L^{-1}.

Es de destacar que para el genotipo M-28 se observó una disminución del número de embriones totales al emplear el medio MIE-2, resultando favorecido con MIE-1, lo que pudiera ser explicado por la concentración del extracto auxínico empleada en el cultivo, que tal vez no resultó adecuada para que este material expresara una mejor respuesta, unido al comportamiento diferencial que ha caracterizado a este genotipo durante las etapas precedentes. Sin embargo, los resultados obtenidos en los genotipos de mayor respuesta mostraron un incremento significativo del número total de ES producidos en el medio MIE-2 con relación al medio MIE-1, demostrándose el efecto favorable de esta variante de cultivo sobre el indicador analizado y los genotipos.

Al respecto, es de destacar que un comportamiento similar fue obtenido por Dublin (1980) al estudiar el proceso de inducción de embriones en el híbrido Arabusta y evaluar el efecto de las auxinas ANA, AIA (ácido indolacético), AIB (ácido indolbutirico), 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenociacético) sobre el mismo, obteniendo que el mayor porcentaje de formación de embriones somáticos (33%) se logró con el AIA, mientras que en los restantes tratamientos los valores obtenidos no rebasaron el 14,2%; resultados que contribuyen a explicar el efecto favorable observado con el extracto auxínico en este estudio, el cual contiene al AIA como fuente de auxina mayoritaria, habiendo sido enunciados los efectos positivos de este regulador sobre los genotipos estudiados. Este mismo autor, al realizar un estudio de dosificación del AIA con el empleo de concentraciones entre 0,5 y 2,0 mg/L^{-1} en la formación de embriones somáticos de Arabusta, obtuvo el mayor valor (37,7%) con 1,0 mg/L^{-1}, resultados que difirieron de lo alcanzado en el presente estudio, donde se obtuvo la mejor respuesta con concentraciones inferiores a la anteriormente referida.

En la tabla 6 se presentan los resultados de la formación de embriones somáticos por fase de desarrollo, obtenidos a partir de las suspensiones celulares cultivadas en medio MIE-2.

Tabla 6. Embriones somáticos de *C. canephora* var. Robusta en las diferentes fases de desarrollo

Genotipo	Embriones por fase de desarrollo (%)		
	Globular	Acorazonado	Torpedo
M-229	22 d	24 cd	54 a
K-234	38 b	28 cd	34 bc
M-28	51 a	27 cd	22 d
ES $\bar{x}$ (±)	2,75**		

Medias con letras comunes no difieren estadísticamente, según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan para $<0,05$; ** significativo para $p<0,01$.

Se observó una mejor respuesta del genotipo M-229 y la fase torpedo (54%), este valor no difirió del resultado alcanzado por el genotipo M-28 para la fase globular (51%), demostrándose el comportamiento precoz de M-229 y la respuesta tardía del genotipo M-28, donde solo se obtuvo un 22% para la fase torpedo en igual periodo de cultivo, conociéndose de la importancia de lograr estadios de desarrollo avanzados. Este comportamiento pudiera deberse a la alta respuesta del genotipo M-229, dada por sus características genéticas, aspecto que se ha corroborado al evaluar otros indicadores durante el proceso de multiplicación vía embriogénesis somática y, por el contrario, a la menor respuesta de M-28, que ha mostrado un comportamiento diferencial para la mayoría de las variables estudiadas, demostrándose su bajo potencial embriogénico. Por su parte, el genotipo K-234, presentó un comportamiento más ba-

lanceado, obteniéndose un 34% de embriones somáticos en fase torpedo, comportamiento que corrobora lo señalado por Flota y Vargas (2003) y Jiménez (2005) acerca de que existen genotipos que responden a los procesos embriogénicos con mayor facilidad que otros ante determinadas condiciones de cultivo.

En el presente estudio se observó un alto grado de asincronía, que es la causa de que las poblaciones de embriones somáticos muestren típicamente un amplio rango de tamaño y de forma; en este caso, el alto grado de asincronía presentado durante la formación de los embriones somáticos resultó desventajoso, desde el punto de vista práctico, por dos razones: primero, la no uniformidad inicial en cuanto a la fase de desarrollo de los embriones, que se reflejó a lo largo del cultivo *in vitro* de la población resultante, y segundo, por la incertidumbre de determinar en un momento dado si en las células no diferenciadas resultaron fallas o presentaron retraso en la embriogénesis.

Germinación y conversión de los embriones somáticos. En la tabla 7 se observan los valores obtenidos durante las evaluaciones realizadas en la etapa de germinación y conversión de los embriones somáticos de los 3 genotipos en estudio. La interacción fue significativa para los factores analizados, existiendo diferencias estadísticas entre los tratamientos. Se obtuvieron porcentajes de germinación elevados, que solamente difirieron para el genotipo M-28 cultivado sobre el medio MDE-1, mostrando el menor valor. Se observó que el medio MDE-2 contentivo del extracto auxínico de los metabolitos bacterianos, en sustitución del ANA, contribuyó al mejor comportamiento de este genotipo, que mostró acción tardía ante las etapas precedentes del proceso de embriogénesis somática. Al parecer, para esta fase de cultivo los requerimientos hormonales de M-28 resultaron favorecidos con el empleo del extracto auxínico, obteniéndose un mayor número de embriones somáticos germinados, niveles que estuvieron en correspondencia con los alcanzados para M-229 y K-234 en ambos medios de cultivo.

Al respecto, en la literatura se señala la importancia de emplear diferentes concentraciones de AIA en el desarrollo de embriones somáticos de diferentes cultivos obtenidos a partir de materiales de baja reactividad, lo que pudiera contribuir a explicar el efecto observado en el genotipo de menor respuesta M-28, con la variante de medio de cultivo descrita. Los resultados obtenidos fueron similares a los señalados por Vázquez *et al*. (1998), que lograron diferentes índices de regeneración en la micropropagación de híbridos de *C. arabica*, valores que estuvieron en correspondencia con el genotipo evaluado. La conversión de los embriones somáticos difiere entre los genotipos, las especies y los sistemas de cultivo (Freire, 2003).

A su vez, es válido destacar que los porcentajes de germinación alcanzados en el presente estudio difirieron de los informados por García y Menéndez (1987), al emplear el ANA en la germinación de embriones somáticos del híbrido de cafeto Catimor, con valores que no superaron 27%.

En la emisión de las hojas verdaderas a los 60 días de cultivo no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos, oscilando los valores entre 50 y 56%. Sin embargo, al analizar la emisión de raíces secundarias se presentaron diferencias significativas, correspondiendo los valores más altos al medio MDE-2, con 71 y 73% para los genotipos M-229 y K-234, respectivamente, seguidos por el genotipo M-28 que logró superar el porcentaje alcanzado en el medio MDE-1 (51%). De forma general, se observó un efecto favorable con

Tabla 7. Germinación y conversión de ES en genotipos de *C. canephora* var. Robusta

Genotipo	Germinación (%) (20 días) MDE-1	MDE-2	Emisión hojas verdaderas (%) (60 días) MDE-1	MDE-2	Emisión raíces secundarias (%) (60 días) MDE-1	MDE-2	Conversión en vitroplantas (%) (65 días) MDE-1	MDE-2
M-229	93 a	94 a	52	56	59 cd	71 ab	51 c	61 a
K-234	92 a	94 a	54	55	57 de	73 a	57 b	60 a
M-28	83 b	91a	50	52	51 e	65 b	39 d	49 c
ES $\bar{x}$ (±)	1,52**		0,82 ns		1,07**		1,16**	

Medias con letras comunes no difieren estadísticamente, según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan para <0,05; ** significativo para p<0,01.

el medio MDE-2, lo que pudiera estar relacionado con las propiedades del extracto auxínico utilizado como sustituto del ANA y las características de los genotipos en estudio, observándose en este caso una mayor acción morfogénica.

En el análisis de la conversión a plántulas se presentaron diferencias significativas, alcanzándose los mayores valores en los genotipos M-229 y K-234 y el medio MDE-2 con un 61 y 60%, respectivamente. Sin embargo, sobre este mismo medio de cultivo, el genotipo M-28 solo alcanzó el 49%, lo que corrobora el marcado efecto genotípico evidenciado en las etapas precedentes. Al respecto, Vázquez *et al*. (1998) señalaron diferencias en los índices de conversión de los embriones somáticos (17-79%) al trabajar con híbridos de *C. arabica.*

La obtención de plantas a partir de embriones somáticos constituye una etapa crítica en el proceso de embriogénesis somática, particularmente en plantas leñosas y semileñosas (Tan y Furtek, 2003), entre las dificultades que se presentan se puede señalar oscurecimiento del hipocotilo; fallo de los embriones somáticos en la emisión de brotes y hojas debido al pequeño tamaño de los cotiledones, lo que provoca la muerte de los mismos (Furtek *et al*., 2001); fallo en la formación del meristemo caulinar (Steinitz *et al*., 2003). Actualmente, en varios cultivos se desarrollan importantes protocolos en aras de superar las dificultades que en dicho sentido pudieran limitar el uso eficiente de métodos biotecnológicos.

Es válido destacar que los valores de conversión obtenidos con el medio MDE-1, aunque difirieron de los anteriormente descritos, son similares a los obtenidos por Cevallos (2000) en esta misma especie, al emplear un medio de cultivo alternativo con el oligogalacturónido Pectimorf, porcentajes que resultaron superados por los alcanzados en el presente estudio con el medio MDE-2, evidenciándose mejoras en la eficiencia de este indicador para el cafeto, aspecto de significación ya que contribuye a la disminución de los niveles de pérdida por no conversión del material regenerado.

Conclusiones

Los genotipos M-229 y K-234 mostraron mayor reactividad durante las fases de cultivo *in vitro*, tanto en los medios de cultivo suplementados con reguladores de crecimiento convencionales como en los alternativos, demostrándose el efecto benéfico del extracto auxínico.

Se evidenció una fuerte relación entre la viabilidad celular y el número de células, ante las diferentes condiciones de cultivo y según la densidad de inóculo utilizada, aspecto de importancia por su posible aplicación práctica.

Se observaron diversas formas en las poblaciones de embriones somáticos, debido a la asincronía, dentro ellas la fase globular, acorazonado y torpedo, resultando desventajoso por la no uniformidad inicial de la fase de desarrollo de los embriones.

Los altos porcentajes de conversión de ES con el empleo del medio MDE-2 evidencian mejoras en la eficiencia de este indicador para el cultivo del cafeto.

Referencias bibliográficas

Barrueto, L. P., Cruz, A. R., Castro, L. H. 2004. Somatic embryogenesis from the coffee cultivars: Rubi, Catuai Vermelho 81 and IAPAR 59. *HortScience*, 39: 130-131.

Barry, D., Bertrand, B., Schlonvoigt, A., Etienne, H. 2002. The morphological variability within a population of coffee somatic embryos produced in a bioreactor affects the regeneration and the development of plants in the nursery. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68: 153-162.

Cerda, F., Aquea, F., Gebauer, M., Medina, C., Arce, P. 2002. Stable transformation of *Pinus radiata* embryogenis tissue by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70: 251-257.

Cevallos, M. 2000. Establecimiento de una metodología eficiente en el proceso de embriogénesis somática del cafeto. Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias, INCA, La Habana.

De Vries, S. 1988. Carrot somatic embryogenesis suspends on the phytohormone-controlled presence of correctly glycosilated extracellular proteins. *Genes and Development*, 2: 462-476.

Dibut, B., Martínez, R., Ríos, Y., Ortega, M., Planas, L., Rodríguez, J., Canizares, K. 2010. Contribución de rizobacterias fijadoras de dinitrógeno a la nutrición de cultivos económicos. En: Caracterización y manejo de microorganismos rizosféricos, Congreso Científico del INCA (17: 2010, nov 23-26, La Habana). Memorias. CD-ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 2010.

Dublin, P. 1980. Induction de bourgeons néoformes et embryogenése somatique. Deux voies de multiplication végétative *in vitro* des, caféier cultivés. *Cafe, Cacao, The*, 24 (2): 121-130.

Etienne, D. B., Bertrand, B. N., Etienne, H. 2002. Comparison of somatic embryogenesis derived coffee (*Coffea arabica* L.) plantlets regenerated *in vitro* or *ex-vitro*: Morphological, mineral and water characteristics. *Annual of Botany*, 90: 77-85.

Flota, V. A., Vargas, V. M. 2003. *In vitro* plant cell culture as the basis for the development of a Research Institute in México: Centro de Investigación Científica de Yucatán. *In vitro Celular Development Biology Plant*, 39: 250-258.

Freire, M. 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal,* 3 (4): 195-209.

Furtek, D., Kasran, R., Chia, T., Jonchiul, L., Mohammed, A., Hartney, V. *et al*. 2001. Biotechnology research by the Malaysian cocoa board. In: *Proceeding of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding*. Maylasia: Kota Kinabalu.

García, D., Rojas, R., Martínez, M., Cuba, M. 1996. Métodos para la evaluación del crecimiento de suspensiones celulares de *Coffea canephora* variedad Robusta. *Cultivos Tropicales,* 17 (1): 85-87.

García, E., Menéndez, A. 1987. Embriogénesis somática a partir de explantes de cafeto "Catimor". *Café, Cacao, The,* 31 (1): 15-22.

Gatita, A. M., Arrieta, G., Espinoza, A. M. 2007. Comparison of three *in vitro* protocols for direct somatic embryogenesis of and plant regeneration of *Coffea arabica* L. CVS. Caturra and Catuai. *Agronomia Costarricense,* 31 (1): 85-94.

González, M. E., Hernández, M. M., Hernández, A. 2007. Comportamiento de diferentes genotipos de cafeto frente al empleo de un biopreparado bacteriano en la callogénesis. *Cultivos Tropicales,* 28 (3): 39-45.

Inca. Start. 1998. Sistema automático para análisis estadístico (Versión 4.10, 1998).

Jiménez, V. M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulators,* 47: 91-110.

Kalyaeva, M. A. 2001. Methylotrophic bacteria promote *in vitro* growth and morphogenesis. *Russian Journal of Plant Physiology,* 48 (4): 514-517.

Mauri, P. V., Manzanera, J. A. 2003. Induction, maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* 10: 1-7.

Montes, S., Martínez, M., Rojas, R., Santana, N., Cuba, M. 1995. Obtención de embriones somáticos a partir de suspensiones celulares de *Coffea canephora* var. Robusta. *Cultivos Tropicales,* 16 (3): 77-81.

Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassoys whith tobbaco tissue cultures. *Physiol Plants,* 15: 473-497.

Ozawa, K., Komamine, A. 1999. Stablisment of a system of High-Frecuency Embryogenesis from Long-Term Cell Suspensión Cultures of Rice (*Orice sativa* L.). *Theorical and Applied Genetics,* 77: 208-216.

Palada, M. 2002. A combined liquid –solid medium procedure for enhancing plant regeneration ability for Norway spruce embrygogenic cultures. 1st International Symposium on Liquid systems for *in vitro* mass propagation of plants. Noruega. Mayo/2002.

Pérez, P. J. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología /J. N. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas.

Santana, N., González, M. E., Valcárcel, M., Canto-Flick, A. Hernández, M. M., Fuentes-Cerda, C. F. *et al*. 2004. Somatic Embryogenesis: A valuable alternativa for propagating selected Robusta coffee (*Coffea canephora*) clones. *In vitro Celular Development Biology Plant,* 40 (1): 95-101.

Shapiro, S. S., Francia, R. S. 1972. An approximate Analysis of Variance Test for Normality. *Journal of the American Statistical Association,* 67: 215-216.

Statistical Graphics Corp. 1999. Stagraphics Plus por Windows 4.1.

Steinitz, B., Kusek, M., Tabib, Y., Paran, I., Zelcer, A. 2003. Pepper (*Capsicum annun* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *In vitro Celular Development Biology Plant,* 39: 296-303.

Tan, C. L., Furtek, D. B. 2003. Develpment of an *in vitro* regeneration system for *Theobroma cacao* from matures tissues. *Plant Sciences,* 164: 407-412.

Tien, T. M., Gaskin, M. H., Hubbell, D. H. 1979. Plant Growth Substance produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennistem americanun* L.). *Applied Enviroment Microbiology,* 37: 219-226.

van Boxtel, J., Berthouly, M. 1996. High frequency somatic embryogenesis from Coffee leaves factors influencing embryogenesis and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. *Plant Cell Tissue Organ Culture,* 44: 7-17.

Vaugh, K. C. 1984. Funtion of polyphenol oxidate in higher plants. *Physiol Plant,* 60: 106-112.

Vázquez, N., Salazar, K., Solano, W., Peseira, A., Bertand, B., Etienne, H. 1998. Embriogénesis de alta frecuencia en híbridos F1 seleccionados de *Coffea arabica* a partir de explantes de hoja: reactividad y eventos histológicos. En: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, REDBIO-98. La Habana 1-5 junio.

von Aderkas, P., Rohr, R., Sundberg, B., Gutmann, M., Dumont, N., Lelu, M. A. 2002. Abscisic acid and its influence on develpoment of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* 69: 111-120.

von Aderkas, P., Lelub, M. A., Label, P. 2001. Plant growth regulators levels during maturation of larch somatic embryos. *Plant Physiology Biochemistry,* 39: 495-502.

von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., Filonova, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* 69: 233-249.

Wang, W., Zhong, J. 2002. Manipulation of ginsenoside heterogeneity in cell cultures of Panax notoginseng by addition of jasmonates. *Journal Biosciences Bioenginering,* 93: 48-53.

Zamarripa, C. A., Ducos J. P., Tessereau H., Bollon H. and V. Petiard (1991). Production d' embryons somatiques de cafeier en milieu liquide: Effets densite d' inoculación et renouvellement du milieu. Café, Cacao, *Thé* 35 (4): 21-26.